

Мутации в генах *BRAF* и *MAP2K1* при волосатоклеточном лейкозе и селезеночной В-клеточной лимфоме из клеток маргинальной зоны

И.А. Якутик, Л.С. Аль-Ради, У.Л. Джулакян, Б.В. Бидерман, А.Б. Судариков

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Игорь Александрович Якутик igorya90@list.ru

Исследованы образцы ДНК пациентов с волосатоклеточным лейкозом (ВКЛ) и селезеночной В-клеточной лимфомой из клеток маргинальной зоны (СЛКМЗ) для выявления активирующих мутаций в генах *BRAF* и *MAP2K1*. Мутация *BRAF V600E* обнаружена у 39 (98 %) из 40 больных ВКЛ и ни у одного пациента с СЛКМЗ. Ни у одного пациента, вошедшего в данное исследование, не выявлены какие-либо другие, отличные от *V600E*, активирующие мутации в экзонах 11 и 15 гена *BRAF*. Мутация *MAP2K1 Q56P* выявлена у 1 (2 %) из 40 пациентов с ВКЛ, характеризующегося экспрессией *IGHV4-34*. Ни у одного больного СЛКМЗ не обнаружены активирующие мутации в экзонах 2, 3 или 11 гена *MAP2K1*, в том числе и среди тех, у кого выявлена экспрессия *IGHV4-34*.

Ключевые слова: селезеночная В-клеточная лимфома, волосатоклеточный лейкоз, ген *BRAF*, ген *MAP2K1*, мутации

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-34-36

BRAF and *MAP2K1* mutations in hairy cell leukemia and splenic marginal zone B-cell lymphoma

I.A. Yakutik, L.S. Al-Radi, H.L. Julhakyan, B.V. Biderman, A.B. Sudarikov

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 125167, Russia

DNA samples from patients with hairy cell leukemia (HCL) and splenic marginal zone B-cell lymphoma (MZBCL) for *BRAF* and *MAP2K1* activating mutations were analyzed. *V600E* mutation of *BRAF* was detected in 39 (98 %) of 40 patients with hairy cell leukemia, and no patient with MZBCL. In none of the patients in this study any other activating mutations than *V600E* in exons 11 and 15 of *BRAF* gene were revealed. *MAP2K1 Q56P* mutation characterized by *IGHV4-34* expression was detected in 1 (2 %) of 40 patients with HCL. In none of the patients with MZBCL activating mutations in the 2, 3 or 11 exons of *MAP2K1* gene have been identified, including those with *IGHV4-34* expression.

Key words: splenic B-cell lymphoma, hairy cell leukemia, *BRAF* gene, *MAP2K1* gene mutations

Введение

Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) — хроническое В-клеточное лимфопролиферативное заболевание (ЛПЗ), обладающее рядом характерных клинико-патологических, иммунофенотипических и молекулярно-биологических черт, позволяющих отличить его от прочих В-клеточных ЛПЗ. Ранее с помощью полноэкзомного секвенирования было продемонстрировано, что мутация в гене *BRAF*, приводящая к аминокислотной замене *V600E*, выявляется у 100 % больных ВКЛ [1], а также была показана конститутивная активация *RAF-МЕК-ERK*-каскада [2, 3]. Вместе эти находки проливают свет на молекулярные механизмы патогенеза данного заболевания, а также вносят существенный вклад в вопросы диагностики и лечения ВКЛ, поскольку позволяют отличить его от сходных В-клеточных ЛПЗ, таких как вариантная форма ВКЛ и селезеночная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны (СЛКМЗ). Больные ВКЛ хорошо отвечают на химиотерапию пуриновыми аналогами — кладрибином и пентостатином, однако при медиане наблюдения 10 лет примерно у 40 % пациентов развивается рецидив, иногда менее восприимчивый к терапии [4].

Эти и другие факты указывают на необходимость совершенствования современных методов терапии ВКЛ. Открытие мутации *BRAF V600E* и активации *RAF-МЕК-ERK*-каскада сделало обоснованным применение таргетной терапии ВКЛ с использованием протеинкиназных ингибиторов, целенаправленно подавляющих активацию мутантной *BRAF*-киназы и киназ *MEK1/2* [5, 6]. В то же время в недавних исследованиях было показано, что больные, имеющие перестройку варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулинов 4-34 (*IGHV4-34*), не несут мутацию *BRAF V600E* и в значительной части случаев характеризуются различными активирующими мутациями в гене *MAP2K1*, кодирующем киназу *MEK1* [7, 8]. Все эти факты указывают на необходимость расширения панели генов, исследуемых при ВКЛ, а также углубления знаний о молекулярных особенностях данного заболевания. Также при анализе литературных данных до сих пор остается неясным патогенез СЛКМЗ [9–12].

В данной работе мы исследовали мутации в генах *BRAF* и *MAP2K1* у больных ВКЛ и СЛКМЗ с целью оценить их частоту и диагностическую значимость на собственной выборке пациентов.

Материалы и методы

Были исследованы 40 пациентов с диагнозом ВКЛ и 24 пациента с диагнозом СЛКМЗ. Диагноз устанавливали, основываясь на стандартных общепринятых диагностических критериях [9, 13, 14], включающих исследование морфологии и иммунофенотипа лимфоидных клеток крови и/или костного мозга [15]. Также проводилось исключение диагноза селезеночных неклассифицируемых лимфом (вариантной формы ВКЛ и лимфомы селезенки с диффузным поражением красной пульпы) [16]. Во всех случаях была выявлена клональная реаранжировка генов тяжелых цепей иммуноглобулинов. Для анализа мутаций была использована геномная ДНК, выделенная из образцов периферической крови, аспиратов костного мозга и биоптатов селезенки пациентов.

Мутацию V600E гена *BRAF* определяли с помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе StepOne-Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) по методике, описанной ранее [17].

Мутации в экзонах 11 и 15 гена *BRAF* и экзонах 2, 3 и 11 гена *MAP2K1* исследовали методом прямого секвенирования по Сэнгеру с применением набора Big Dye 1.1 XTerminator Cycle Sequencing Kit и капиллярного секвенатора ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Для секвенирования использовали следующие праймеры: *BRAF*-E11F: 5'-CTTCTGTATCCCTCTCAGGC-3', *BRAF*-E11R: 5'-TGGAGGAGTCCTGAACATAATCA-3', *BRAF*-E15F: 5'-TACCTAACTCTTCATAATGCTTGC-3', *BRAF*-E15R: 5'-GTAACCTCAGCAGCATCTCAGGG-3', *MEK1*-E2F: 5'-GACCTGGAGCTTTCTTTCCA-3', *MEK1*-E2R: 5'-TCCCCAGGCTTCTAAGTACC-3', *MEK1*-E3F: 5'-CCAATGCCTGCCTTAGTACA-3', *MEK1*-E3R: 5'-TCACCTCCAGACCAAAGAT-3', *MEK1*-E11F: 5'-AGGCAGAGTTACTGTCTCCA-3', *MEK1*-E11R: 5'-GCCAATCCACTTAGGGGAAC-3'.

Мутационный статус переменных участков тяжелых цепей генов иммуноглобулинов определяли по методике, описанной ранее [18].

Результаты и обсуждение

Мутация *BRAF V600E* была выявлена в 39 из 40 случаев ВКЛ и ни в одном из случаев СЛКМЗ. Принимая во внимание, что патогенные мутации в гене *BRAF* не ограничиваются вариантом *V600E* [19] и что основное число активирующих мутаций локализовано в экзонах 11 и 15 [19], мы просеквенировали соответствующие экзоны данного гена у всех пациентов, вошедших в исследование. Ни у одного из больных ВКЛ или СЛКМЗ не были выявлены активирующие мутации в экзонах 11 и 15 гена *BRAF*.

В соответствии с литературными данными активирующие мутации в гене *MAP2K1*, кодирующем MAP-киназу MEK1, выявляются при вариантной форме ВКЛ и в тех случаях, когда при ВКЛ экспрессируется *IGHV4-34* [8]. Протеинкиназа MEK1 является важным

элементом механизма передачи сигнала через MAP-киназный каскад и, будучи фосфорилированной протеинкиназой *BRAF*, передает сигнал нижележащим участникам каскада – протеинкиназам *ERK1* и *ERK2*. Поскольку активирующие мутации киназы MEK1 чаще всего затрагивают N-концевой ауторегуляторный домен [8, 20, 21] и активационный сегмент киназного домена [20, 21], мы просеквенировали экзоны 2, 3 и 11 гена *MAP2K1*. Мутация с.167A>C, приводящая к замене Q56P в аминокислотной последовательности белка MEK1, была обнаружена у 1 пациента с ВКЛ. В результате определения мутационного статуса генов иммуноглобулинов было выяснено, что это единственный пациент в нашей выборке, относящийся к подгруппе *IGHV4-34*-положительных ВКЛ. Важно отметить, что этот случай имел нетипичную картину поражения костного мозга – морфологически выявлялись лишь рассеянные лимфоидные клетки, но при иммуногистохимическом исследовании обнаруживалась выраженная интерстициальная лимфоидная инфильтрация CD20⁺CD79a⁺ В-клетками. При этом в биоптате удаленной селезенки морфологически, иммуногистохимически и фенотипически диагноз ВКЛ был подтвержден, в то время как повторное исследование показало наличие мутации *MAP2K1 Q56P* и отсутствие мутации *BRAF V600E* в ткани селезенки. Ни у одного из 24 пациентов с СЛКМЗ не было обнаружено мутаций в гене *MAP2K1*. Важно отметить, что среди больных СЛКМЗ также были 2 пациента с экспрессией *IGHV4-34*, что хорошо согласуется с данными других исследователей [22].

В результате нашего исследования на выборке пациентов, обратившихся в Гематологический научный центр в период с 2005 по 2015 г., было показано, что мутация *BRAF V600E* встречается не во всех случаях ВКЛ (в нашем исследовании – 98 % (39/40)). Было подтверждено, что у *BRAF V600E*-отрицательных больных могут выявляться активирующие мутации в других генах, кодирующих протеинкиназы – компоненты MAP-киназного каскада, таких как *MAP2K1*. Исследование мутационного статуса генов тяжелых цепей иммуноглобулинов выявляет в данном случае использование гена *IGHV4-34* в перестроенном опухолевом клоне. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что именно активация RAF-MEK-ERK-каскада лежит в основе патогенеза ВКЛ, а конкретные мутации, приводящие к образованию конститутивно активированных форм различных киназ, должны рассматриваться как причины данной активации. Также можно предположить, что спектр возможных причин вышеописанной активации не ограничивается обнаруженными на данный момент мутациями, а имеет потенциально значительно больший масштаб как за счет различных мутаций одного и того же гена, так и за счет мутаций в других генах каскада. Отсутствие же экспериментальных данных, подтверждающих это предположение, объясняется низкой частотой подобных явлений вместе с относительной

редкостью данного заболевания и, как следствие, небольшими выборками пациентов. Полученные нами данные согласуются с уже имеющимися сообщениями других исследователей о редких случаях *BRAF V600E*-негативного ВКЛ [7, 8], а также явно указывают на большое значение исследования мутационного статуса генов иммуно-

глобулинов и необходимость расширения панели мутаций и генов, исследуемых при диагностике ВКЛ. Более того, эти данные указывают на возможность применения новых таргетных препаратов, нацеленных на подавление активности *RAF-MEK-ERK*-каскада (ингибиторы *MEK* и *ERK*), для лечения резистентных форм ВКЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tiacci E., Trifonov V., Schiavoni G. et al. *BRAF* mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011;364(24): 2305–15.
2. Kamiguti A.S., Harris R.J., Slupsky J.R. et al. Regulation of hairy-cell survival through constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene* 2003;22(15):2272–84.
3. Tiacci E., Schiavoni G., Martelli M.P. et al. Constant activation of the *RAF-MEK-ERK* pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia. *Haematologica* 2013;98(4):635–9.
4. Pettirossi V., Santi A., Imperi E. et al. *BRAF* inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood* 2015;125(8):1207–16.
5. Урнова Е.С., Аль-Ради Л.С., Кузьмина Л.А. и др. Успешное применение вемурафениба у больного с резистентной формой волосатоклеточного лейкоза. *Терапевтический архив* 2013;85(7):76–8. [Urnova E.S., Al'-Radi L.S., Kuz'mina L.A. et al. Successful use of vemurafenib in a patient with resistant hairy cell leukemia. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archives* 2013;85(7):76–8. (In Russ.)].
6. Peyrade F., Re D., Ginet C. et al. Low-dose vemurafenib induces complete remission in case of hairy-cell leukemia with a *V600E* mutation. *Haematologica* 2013;98(2):e20–2.
7. Xi L., Arons E., Navarro W. et al. Both variant and *IGHV4-34*-expressing hairy cell leukemia lack the *BRAF V600E* mutation. *Blood* 2012;119(14):3330–2.
8. Waterfall J.J., Arons E., Walker R.L. et al. High prevalence of *MAP2K1* mutations in variant and *IGHV4-34*-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet* 2014;46(1):8–10.
9. Джулакян У.Л., Гриншпун Л.Д. Селезеночная лимфома из клеток маргинальной зоны (лимфоцитомы селезенки) у пожилых пациентов: клиника, диагностика, лечение. В сб.: *Гериатрическая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах*. Под ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивника. М., 2012. С. 237–44. [Dzhulakyan U.L., Grinshpun L.D. Splenic marginal zone lymphoma (spleen lymphocytoma) in elderly patients: clinical features, diagnosis, treatment. In: *Geriatric hematology. Blood disorders in the older age groups*. Ed. by L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. Moscow, 2012. Pp. 237–44. (In Russ.)].
10. Джулакян У.Л., Обухова Т.Н., Капланская И.Б. Лимфоцитомы селезенки с перестройкой локуса гена *BCL-6/3q27*. *Гематология и трансфузиология* 2009;54(3):48–52. [Dzhulakyan U.L., Obukhova T.N., Kaplanskaya I.B. Spleen lymphocytoma with *BCL-6/3q27* rearrangement. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2009;54(3):48–52. (In Russ.)].
11. Джулакян У.Л. Вирусные гепатиты и лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки: подходы к терапии. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2012;6(1):120–3. [Dzhulakyan U.L. Viral hepatitis and splenic marginal zone lymphoma: therapy approaches. *Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Basic Research and Clinical Practice* 2012;6(1):120–3. (In Russ.)].
12. Никитин Е.А., Баранова А.В. Патогенез В-клеточных лимфатических опухолей. В кн.: *Клиническая онкогематология*. Под ред. проф. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007. С. 645–78. [Nikitin E.A., Baranova A.V. The pathogenesis of B-cell lymphoid tumors. In: *Clinical oncohematology*. Ed. by prof. M.A. Volkova. Moscow: Meditsina, 2007. Pp. 645–78. (In Russ.)].
13. Foucar K., Falini B., Catovsky D. et al. (eds.) *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC, 2008. Pp. 188–90.
14. Аль-Ради Л.С., Пивник А.В., Зыбунова Е.Е. и др. Волосатоклеточный лейкоз у пожилых: клиника, диагностика, лечение аналогом пурина 2-CdA. *Клиническая геронтология* 2004;(5):7–13. [Al'-Radi L.S., Pivnik A.V., Zybunova E.E. et al. Hairy cell leukemia in the elderly: clinical features, diagnosis, treatment with purine analogue 2-CdA. *Klinicheskaya gerontologiya = Clinical Gerontology* 2004;(5):7–13. (In Russ.)].
15. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М. и др. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. *Онкогематология* 2015;(1):37–45. [Khvastunova A.N., Al'-Radi L.S., Kapranov N.M. et al. Using a cell biochip in the diagnosis of hairy cell leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;(1):37–45. (In Russ.)].
16. Julhakan H.L., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N. et al. The experience of diagnostic and treating splenic diffuse red pulp lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15 Suppl 2:69–70.
17. Якутик И.А., Аль-Ради Л.С., Бидерман Б.В. и др. Применение аллель-специфичной ПЦП-РВ для определения мутации *B-RAF V600E* у больных волосатоклеточным лейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2014;59(2):16–9. [Yakutik I.A., Al'-Radi L.S., Biderman B.V. et al. Detection of *B-RAF V600E* mutation in patients with hairy cell leukaemia by allele-specific RT-PCR. *Gematologiya i transfuziologiya = Haematology and Transfusiology* 2014;59(2):16–9. (In Russ.)].
18. Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Сергиенко Т.Ф. и др. Репертуар генов тяжелой цепи иммуноглобулинов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе в России и Беларуси. *Онкогематология* 2012;(3):38–43. [Biderman B.V., Nikitin E.A., Sergienko T.F. et al. The repertoire of heavy chain immunoglobulin genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia in Russia and Belarus. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2012;(3):38–43. (In Russ.)].
19. Dahlman K.B., Xia J., Hutchinson K. et al. *BRAF (L597)* mutations in melanoma are associated with sensitivity to *MEK* inhibitors. *Cancer Discov* 2012;2(9):791–7.
20. Chakraborty R., Hampton O.A., Shen X. et al. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in *MAP2K1* and *BRAF* support a central role for *ERK* activation in *LCH* pathogenesis. *Blood* 2014;124(19):3007–15.
21. Van Allen E.M., Wagle N., Sucker A. et al. The genetic landscape of clinical resistance to *RAF* inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2014;4(1):94–109.
22. Джулакян У.Л., Бидерман Б.В., Гемдзян Э.Г. и др. Молекулярный анализ генов иммуноглобулина в опухолевых В-клетках при лимфоме селезенки из клеток маргинальной зоны. *Терапевтический архив* 2015;87(7):58–63. [Dzhulakyan U.L., Biderman B.V., Gemdzyan E.G. et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in tumor cells in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archives* 2015;87(7):58–63. (In Russ.)].